

ヒト脂肪組織から単離した Multiline-differentiating stress enduring (Muse)細胞からの色素細胞への分化誘導とその定量的解析

著者	山内 丈史
号	86
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医博第3671号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00123353

氏 名	やまうち たけし 山内 丈史
学位の種類	博士(医学)
学位授与年月日	平成29年3月24日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科(博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	ヒト脂肪組織から単離した Multiline-differentiating stress enduring (Muse)細胞からの色素細胞への分化誘導とその定量的解析
論文審査委員	主査 教授 相場 節也 教授 中山 啓子 教授 後藤 昌史

論文内容要旨

Multiline-differentiating stress enduring (Muse) 細胞は、ヒト生体由来幹細胞である骨髄や真皮、あるいは培養細胞中に存在している多能性幹細胞である。Muse 細胞は、ヒト ES 細胞や iPS 細胞等の多能性幹細胞とは違い、元々生体内に存在しており、ES 細胞で確認されたような腫瘍形成能を持たず、多能性獲得のための遺伝子導入等の操作を必要としない多能性幹細胞である。これまでの報告から Muse 細胞はヒト脂肪組織内でも存在していることが示されている。脂肪組織は、皮膚外科手術の余剰皮膚や、脂肪吸引等の美容整形施術の余剰廃棄物として回収が可能である。このように比較的低侵襲で脂肪組織由来の間葉系幹細胞の採取が可能であること、また、これら脂肪組織が通常の医療廃棄物として処理されていることから、その利用に際しての倫理的な問題がほとんどないと考えられる。当研究室では培養線維芽細胞由来の Muse 細胞を色素細胞へと分化誘導に成功したことを報告している。しかし、ヒト生体組織から直接回収した Muse 細胞の維持と分化誘導能についての詳細は検証されていない。そこで本研究では、ヒト組織より採取した脂肪組織からヒト脂肪組織由来 Muse 細胞を単離し、①脂肪組織 1g 当たり Muse 細胞がどれだけ含まれているのか、②採取できた Muse 細胞がどれだけ割合で色素細胞へと分化誘導できたのかを検討した。本研究は東北大学倫理委員会の承認を得て行われた。まず、皮膚外科手術の際に出た余剰な脂肪組織を得て、ヒト脂肪組織をコラゲナーゼで処理後、ヒト脂肪組織由来幹細胞 (Adipose-MSCs) 分離培養した。増殖した Adipose-MSCs から SSEA3 陽性細胞を FACS で単離したところ、3%の SSEA3 陽性細胞が回収できた。Muse 細胞は採取した患者の年齢が若いほど多く脂肪組織中に存在していることが明らかとなった。分離した Adipose-MSCs 由来 Muse 細胞はアルカリフォスファターゼ染色、 α -SMA、Neurofilament、 α -fetoprotein が陽性であり、多能性を有することが確認でき、Wnt3a、Stem cell factor、Endothelin 3 などの 10 因子を含む培地で 6 週間培養することで、色素細胞マーカー分子と L-DOPA 反応陽性細胞の出現を確認した。分化誘導した Muse 細胞由来色素細胞を色素細胞特異的タンパクである gp100 で免疫染色を行ったところ、陽性細胞が約 40% 存在したことから、Muse 細胞の少なくとも約 40% は機能的色素細胞へと分化誘導できたと言える。Muse 細胞由来色素細胞は 6 週間の培養中に約 1000 倍に増えており、今回の検討で 1 万 5 千細胞の Muse 細胞から分化誘導できた色素細胞は約 400 万細胞であり、細胞治療に十分に使用できる細胞であると考えられる。また、どの患者から採取した Muse 細胞でも色素細胞は誘導できた。これらの結果は、生体組織由来の Muse 細胞は年齢が若いほど豊富に体内に存在していることを示しており、採取したドナーの年齢によらず多能性を保持し、遺伝子改変を行うことなく、色素細胞を誘導しうることを示した。

また、Muse 細胞を臨床応用するためには採取時にできるだけ多く採取する必要がある。そこで我々

は、Muse 細胞の多能性維持のための分子機序の解明を行った。その結果、SSEA3 陰性 adipose-MSCs を分離後培養することにより、SSEA3 陽性細胞が出現していることが判明した。すなわち、adipose-MSCs は可塑性を持ち、間葉系幹細胞よりも上位の多能性幹細胞に性質が変化することが示唆された。また、この現象は Wnt3a を添加した培地で培養することによりさらに SSEA3 陽性細胞の割合が増加することが判明した。

以上のことから、adipose-MSCs 由来 Muse 細胞から色素細胞を分離することができた。この技術は将来的に色素脱失を認められる疾患に対して有効な治療法と考えられる。臨床へ応用するためには、色素細胞へと分化できなかった Muse 細胞の割合、Muse 細胞由来色素細胞が腫瘍化するかどうかを確認する必要がある。今回、Muse 細胞から分化誘導された色素細胞の割合は判明したが、移植後の腫瘍化は検討しなかったため、ヌードマウスに移植することで腫瘍化の有無を検討する必要があるが、Muse 細胞由来色素細胞は自己移植などの医療に役立つ可能性がある。

審査結果の要旨

博士論文題目 ヒト脂肪組織から単離した Multilineage-differentiating stress enduring (Muse)細胞からの色素細胞への分化誘導とその定量的解析

所属専攻・分野名 医科学専攻 ・ 皮膚科学 分野

学籍番号 B3MD5122 氏名 山内 丈史

本論文では、ヒト脂肪組織中に含まれる多能性幹細胞である Multilineage-differentiating stress enduring (Muse) 細胞を定量化し、由来個体に関わらず Muse 細胞の多能性の発現、分化能の有無を確認し、また尋常性白斑への治療を行うため色素細胞への分化誘導を試みた。その内容は以下の通りである。

これまで真皮、骨髄幹細胞や脂肪組織由来幹細胞などヒト間葉系幹細胞中に Muse 細胞が数%存在していることが知られていた。Telomerase 活性が低く、腫瘍形成能が低いと考えられる Muse 細胞は間葉系幹細胞中に存在しているため、臨床への応用に障害が低く、より安全な医療を患者へ提供できると考えられている。

しかしながら、Muse 細胞は他の ES 細胞や iPS 細胞のように無限増殖能がないと考えられているため、臨床応用に十分な数の Muse 細胞を獲得するためには、患者より低侵襲で大量に Muse 細胞を採取できる組織を決定する必要がある。本論文では患者より低侵襲で比較的多量に採取できる脂肪組織に注目し、脂肪組織より分離できた Muse 細胞数を定量化し、尋常性白斑の治療へと応用するため色素細胞への分化を誘導した。

結果として、Muse 細胞はヒト脂肪組織 10g 中に少なくとも 4 万細胞含まれていることが分かり、また由来個体に関わらず、脂肪組織由来 Muse 細胞は多能性を持ち、三胚葉に由来する細胞へと分化誘導できることが分かった。また、脂肪組織由来 Muse 細胞を色素細胞誘導培地で分化誘導することによって機能的な色素細胞を分化誘導することも明らかにした。このことは、今後 Muse 細胞を用いた再生医療において皮下脂肪が Muse 細胞を豊富に含み多量の Muse 細胞の採取できること、またそれを利用し尋常性白斑の新たな治療法が可能であることを明らかにした。

興味深いことに、Muse 細胞から色素細胞への分化は神経堤からの色素細胞発生と同様の時間軸で分化抗原を発現し、色素細胞の発生を理解するうえで格好の実験系を提供することも示した。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。